

New antifungal peptide induced in Drosophila by bacteria

Patent Number: FR2725992
Publication date: 1996-04-26
Inventor(s):
Applicant(s): RHONE-POULENC AGROCHIMIE (FR)
Requested Patent: ☐ FR2725992
Application Number: FR19940013044 19941025
Priority Number(s): FR19940013044 19941025
IPC Classification: C07K14/435 ; A01N63/02 ; A61K38/17
EC Classification: A01N63/02, C07K14/435
Equivalents:

Abstract

The peptide of formula (I) is new: DCLSGRYKGP¹CAVWDNETCR²RVCKEEGRSS³GHCSPSLKCW⁴CEGC⁵ (I). In an example, Drosophila were pricked with a needle previously dipped in a suspension of *Micrococcus luteus* and *E.coli*. After 24 hrs. at 25 deg C, the insects were killed by freezing, sieved and abdomens milled at liq. N2 temp. The residue powder was extd. for 30 mins. with 10 vol. 0.1% TFA, centrifuged and the supernatant put on to a Sep-Pak C18 column. This was washed with 0.05% TFA, then (I) recovered by elution with a 10-80% step gradient of MeCN in 0.05% TFA.

Data supplied from the esp@cenet database - I2

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

①1 N° de publication :
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

2 725 992

②1 N° d'enregistrement national : 94 13044

⑤1 Int Cl⁸ : C 07 K 14/435, A 01 N 63/02, A 61 K 38/17

⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②2 Date de dépôt : 25.10.94.

③0 Priorité :

④3 Date de la mise à disposition du public de la
demande : 26.04.96 Bulletin 96/17.

⑤6 Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du
présent fascicule.*

⑥0 Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

⑦1 Demandeur(s) : RHONE POULENC AGROCHIMIE —
FR.

⑦2 Inventeur(s) :

⑦3 Titulaire(s) :

⑦4 Mandataire :

⑤4 PEPTIDE ANTIFONGIQUE.

⑤7 1. Peptide antifongique.

2. Il est de formule:

DCLSGRYKGP CAVWDNETCR RVCKEEGRSS
GHCSPSLKCW CEGC.

3. Il est utilisable pour le traitement antifongique des
plantes et dans la thérapie humaine et animale.

FR 2 725 992 - A1



Peptide antifongique

La présente invention a pour objet un nouveau peptide ayant des propriétés antifongiques, des compositions utilisables en agriculture et en thérapie humaine ou animale contenant ce peptide comme matière active. L'invention concerne également un procédé de préparation de ce peptide.

On sait de longue date que les insectes présentent une résistance efficace contre les bactéries. Cette défense est pour une large part basée sur la synthèse rapide de plusieurs familles de peptides. Cette défense est due à la synthèse rapide de plusieurs familles de peptides à large spectre d'activité. Cette synthèse est induite par une blessure septique ou par l'injection d'une faible dose de bactéries.

De plus il est connu que les insectes ont développé une résistance importante vis à vis des champignons.

Il a maintenant été isolé, à partir d'une induction chez la drosophile, un peptide, qui présente des caractéristiques remarquables ainsi que des propriétés fongicides notamment contre les champignons responsables des maladies des plantes et les champignons de la pathologie humaine et animale. Au sens de l'invention on entend par propriétés antifongiques aussi bien les propriétés fongicides que les propriétés fongistatiques.

Plus particulièrement un premier aspect de l'invention concerne le peptide de formule:

DCLSGRYKGP CAVWDNETCR RVCKEEGRSS GHCSPSLKCW CEGC

Cette molécule, de taille réduite, comporte 8 cystéines formant 4 ponts disulfures intramoléculaires. Elle est appelée dans la suite "drosomycine".

Elle présente une stabilité chimique exceptionnelle. Elle est notamment inerte vis à vis des protéases en particulier la protéase V8, la trypsine, la chymotrypsine, l'élastase, la thermolysine et la pepsine, dans les conditions préconisées par les fournisseurs (Takara, Boehringer et Sigma). Elle n'est pas affectée par des incubations dans des solutions de pH variant de 2 à 10. De plus, elle est thermiquement stable, par exemple pendant 30 mn dans l'eau à l'ébullition.

Un second aspect de l'invention concerne un procédé pour l'obtention et l'isolement du peptide ci-dessus, qui est caractérisé en ce que successivement:

- a) on fait agir sur des drosophiles au moins un inducteur bactérien de la synthèse biologique de la molécule;
- b) on effectue l'extraction par mise en contact d'un broyat de drosophiles obtenues précédemment avec un milieu acide sous agitation, puis par centrifugation;

- c) on fractionne le surnageant avec séparation par lavage des molécules hydrophiles et élution des molécules hydrophobes par des éléments appropriés sur colonne séparatrice
- d) on purifie les extraits.
- e) on caractérise le peptide.

La première étape (induction bactérienne), est réalisée par simple agression physique telle qu'une blessure par exemple une piqure, ou bien, et de préférence, à partir de drosophiles adultes en les anesthésiant à l'aide d'un gaz anesthésiant, par exemple du gaz carbonique ou tout gaz ayant des effets similaires, et en les immunisant par piqure thoracique à l'aide d'une aiguille de préférence plongée avant chaque inoculation dans une suspension bactérienne. De préférence, l'inoculation est effectuée avec au moins une bactérie choisie dans le groupe comprenant les bactéries (Gram positif) et les bactéries (Gram négatif). Comme exemple représentatif préféré de bactérie (Gram positif), on peut citer *Micrococcus luteus*. Comme exemple représentatif préféré de bactérie (Gram négatif), on peut citer *Escherichia coli*. De manière plus préférée on peut utiliser simultanément au moins une bactérie choisie dans le groupe comprenant les bactéries (Gram positif) et au moins une bactérie choisie dans le groupe comprenant les bactéries (Gram négatif).

De manière préférée la seconde étape (extraction) on met en contact le broyat de drosophiles ou l'hémolymph de drosophiles avec un milieu acide constitué d'une solution acide d'un acide ou neutre (de pH de 2 à 7). La solution peut être une solution d'un acide minéral ou organique comme par exemple d'acide fluoroacétique. L'addition habituelle d'un inhibiteur de protéase n'est ici pas nécessaire en raison de la résistance remarquable naturelle du peptide drosomycine vis à vis des protéases. L'extrait obtenu est ensuite centrifugé à froid à une vitesse de 5000 à 20000 rpm, pendant 15 à 60 mn.

De manière préférée la troisième étape (fractionnement), le lavage des molécules solubles dans l'eau est effectué avec une solution acide diluée et l'élution des molécules hydrophobes avec un éluant approprié. On obtient de bons résultats avec de l'acide trifluoroacétique pour le lavage et un éluant contenant des quantités croissantes d'acétonitrile en solution acide diluée.

De manière préférée la quatrième étape (purification) est effectuée avec un éluant convenable qui peut être différent ou identique à celui de la phase précédente.

De manière préférée, dans la dernière étape (caractérisation), la nature du peptide est analysée selon la méthode de séquençage par dégradation d'Edman (Acta Chemica Scandinavia 10 (1956) p: 761-768). Selon cette méthode on obtient la structure suivante:

DXLSGRYKGP XAVWDNETXR RVXKEEGRSS GHXSPSLKCW XEGX

3
 dans laquelle X est un chaînon non identifiable. La molécule a alors été soumise à une réduction suivie d'une alkylation : on a obtenu la séquence suivante:

DCLESGRYKGP CAVWDNETCR RVCKEEGRSS GHCSPSLKCW CEGC

La masse mesurée de la drosomycine est de 4889,1.

Selon un autre aspect l'invention a pour objet une composition antifongique utilisable pour la protection des plantes contre les maladies fongiques.

Selon un autre aspect l'invention a pour objet un procédé de protection des plantes contre les maladies fongiques, caractérisé en ce qu'on applique le peptide sur les plantes.

Selon un autre aspect l'invention a pour objet une composition antifongique utilisable pour la lutte contre les maladies fongiques de l'homme et des animaux.

Les exemples suivants illustrent l'obtention et les propriétés antifongiques du peptide et des compositions selon l'invention.

Exemple 1: Isolement et caractérisation du peptide

on procède selon les étapes suivantes:

- induction naturelle de la synthèse biologique :

Les drosophiles sont anesthésiées au gaz carbonique et immunisées par piqure au niveau thoracique à proximité de l'insertion alaire à l'aide d'une aiguille plongée avant chaque inoculation dans une suspension bactérienne de *Micrococcus luteus* (Gram positif) et d'*Escherichia coli* 1106 (Gram négatif). Les insectes sont conservés à 25°C durant 24 heures et tués par congélation dans l'azote liquide.

- extraction et de purification :

Les pattes, les ailes et les têtes d'adultes de drosophiles sont éliminées par tamisage, le thorax et les abdomens sont broyés en présence d'azote liquide durant 30 minutes dans un mortier maintenu au froid. A la poudre ainsi obtenue sont ajoutés 10 volumes d'eau acidifiée [0,1% d'acide trifluoroacétique (TFA 0,1%)] contenant de l'aprotinine (total de 2 mg). Après 30 minutes d'extraction sous agitation, l'extrait est centrifugé à 10.000 rpm pendant 30 minutes à 4°C. Le surnageant ainsi obtenu est immédiatement soumis aux différentes étapes de la purification.

Fractionnement de l'extrait sur cartouches Sep-Pak C18

Après dépôt de l'extrait sur des cartouches Sep-Pak C18, les molécules à caractère hydrophile sont éliminées par un simple lavage par 5 ml d'eau acidifiée (TFA 0,05%). L'élution des molécules hydrophobes est réalisée avec des solutions de 10, 40 et 80% d'acétonitrile en eau acidifiée (TFA 0,05%).

Les fractions recueillies sont dénommées "Elution 10%", "Elution 40%" et "Elution 80%" et concentrées sous vide. Les fractions sont ensuite reconstituées avec de l'eau qualité HPLC avant l'analyse en HPLC.

Purification par HPLC des molécules à activité antibactérienne

La fraction "Elution 10%" est analysée sur une colonne de phase inverse Aquapore OD 300 C18 avec un gradient linéaire d'acétonitrile de 0 à 40% dans l'eau acidifiée (TFA 0,05%) en 90 minutes (soit une augmentation de 0,44% d'acétonitrile par minute) pour un débit de 1 ml/min. La fraction "Elution 40%" est analysée sur la même colonne que la fraction "Elution 10%". L'élution est réalisée dans un gradient linéaire d'acétonitrile de 2 à 52% dans l'eau acidifiée (TFA 0,05%) en 90 minutes (progression de 0,55% d'acétonitrile par minute) à un débit de 1 ml/min.

Exemple 2: Test in vitro: Mesure de l'activité antifongique par microspectrophotométrie

Les spores des champignons à tester (à une concentration finale de 10^4 spores/ml) sont mises en suspension dans un milieu de culture contenant du bouillon de pomme de terre (Potato Dextrose Broth, DIFCO) à 1/2 force ionique (12g/l). Deux antibiotiques sont rajoutés au milieu de culture: la tétracycline (10µg/ml) et du claforan (100µg/ml). On dépose 20 µl de chaque fraction contenant la drosomycine à analyser dans des plaques de microtitration en présence de 80 µl de milieu de culture contenant les spores. Au bout de 24 heures d'incubation à 25°C dans l'obscurité, on observe sous microscope la croissance des champignons. Au bout de 48 heures on évalue la croissance par mesure de l'absorbance à 600nm à l'aide d'un lecteur de plaques ELISA.

Dans ces conditions on observe: une activité totale à une concentration de 20µg/ml sur *Botrytis cinerea* et *Neurospora crassa* (avec sels) et une inhibition de 50% (sans sels) à une concentration (C.I. 50) de:

- 1,2 µM sur *Fusarium culmorum* et *Botrytis cinerea*.
- 1,9 µM sur *Alternaria brassicola*.
- 1,4 µM sur *Alternaria longipes*.
- 1,8 µM sur *Nectria haematococca*.
- 4,2 µM sur *Fusarium oxysporum*.
- 3,2 µM sur *Aschochyta pisi*.
- 0,6 µM sur *Neurospora crassa*

Sur *Aspergillus fumigatus* sous forme de spores, on observe une inhibition de 50% à une concentration de 10 µM.

Ces résultats montrent l'excellente activité antifongique du peptide selon l'invention, activité qui est bien supérieure à l'activité des peptides connus.

5

L'invention concerne donc également un procédé de traitement des plantes cultivées atteintes ou susceptibles d'être atteintes par les maladies fongiques caractérisé en ce que l'on applique sur les parties aériennes de ces plantes une dose efficace d'un composé selon l'invention. Par dose efficace, on entend une quantité suffisante pour permettre le contrôle et la destruction des champignons présents sur ces plantes cultivées. Les doses d'utilisation peuvent toutefois varier dans de larges limites selon le champignon à combattre, le type de culture, les conditions climatiques, et selon le composé utilisé.

En pratique, les composés s'appliquent avantageusement à des doses de 0,002 à 5 kg/ha, et de préférence de 0,005 à 1 kg/ha.

Par maladies fongiques, on entend les maladies causées par les champignons phytopathogènes, notamment ceux de la famille des ascomycètes, adélomycètes.

Parmi les cultures pouvant faire l'objet d'un traitement antifongique à l'aide d'un composé selon l'invention, on peut citer le riz, les céréales, notamment le blé et l'orge, ainsi que les plantes arboricoles, fruitières, légumières.

La présente invention a également pour objet des compositions, utilisables comme agents antifongiques, contenant comme matière(s) active(s) un (ou plusieurs) composé selon l'invention tel que décrit précédemment, en mélange avec les supports solides ou liquides, acceptables en agriculture et les agents tensio-actifs également acceptables en agriculture. En particulier sont utilisables les supports inertes et usuels et les agents tensio-actifs usuels. Ces compositions recouvrent non seulement les compositions prêtes à être appliquées sur la culture à traiter au moyen d'un dispositif adapté, tel qu'un dispositif de pulvérisation, mais également les compositions concentrées commerciales qui doivent être diluées avant application sur la culture.

Ces compositions peuvent contenir aussi toute sorte d'autres ingrédients tels que, par exemple, des colloïdes protecteurs, des adhésifs, des épaississants, des agents thixotropes, des agents de pénétration, des stabilisants, des séquestrants, etc... Plus généralement les composés utilisés dans l'invention peuvent être combinés à tous les additifs solides ou liquides correspondant aux techniques habituelles de la mise en formulation.

D'une façon générale, les compositions selon l'invention contiennent habituellement de 0,05 à 95 % environ (en poids) d'un composé selon l'invention (appelé par la suite matière active), un ou plusieurs supports solides ou liquides et, éventuellement, un ou plusieurs agents tensioactifs.

Par le terme "support", dans le présent exposé, on désigne une matière organique ou minérale, naturelle ou synthétique, avec laquelle le composé est combiné pour faciliter son application sur la plante, sur des graines ou sur le sol. Ce support est donc généralement inerte et il doit être acceptable en agriculture, notamment sur la plante traitée. Le support

6

peut être solide (argiles, silicates naturels ou synthétiques, silice, résines, cires, engrais solides, etc...) ou liquide (eau, alcools, notamment le butanol etc...).

L'agent tensioactif peut être un agent émulsionnant, dispersant ou mouillant de type ionique ou non ionique ou un mélange de tels agents tensioactifs. On peut citer par exemple des sels d'acides polyacryliques, des sels d'acides lignosulfoniques, des sels d'acides phénolsulfoniques ou naphthalènesulfoniques, des polycondensats d'oxyde d'éthylène sur des alcools gras ou sur des acides gras ou sur des amines grasses, des phénols substitués (notamment des alkylphénols ou des arylphénols), des sels d'esters d'acides sulfosucciniques, des dérivés de la taurine (notamment des alkyltaurates), des esters phosphoriques d'alcools ou de phénols polyoxyéthylés, des esters d'acides gras et de polyols, les dérivés à fonction sulfates, sulfonates et phosphates des composés précédents. La présence d'au moins un agent tensioactif est généralement indispensable lorsque le composé et/ou le support inerte ne sont pas solubles dans l'eau et que l'agent vecteur de l'application est l'eau.

Ainsi donc, les compositions à usage agricole selon l'invention peuvent contenir les matières actives selon l'invention dans de très larges limites, allant de 0,05 % à 95 % (en poids). Leur teneur en agent tensio-actif est avantageusement comprise entre 5 % et 40 % en poids.

Ces compositions selon l'invention sont elles-mêmes sous des formes assez diverses, solides ou liquides.

Comme formes de compositions solides, on peut citer les poudres pour poudrage (à teneur en composé pouvant aller jusqu'à 100 %) et les granulés, notamment ceux obtenus par extrusion, par compactage, par imprégnation d'un support granulé, par granulation à partir d'une poudre (la teneur en composé dans ces granulés étant entre 0,5 et 80 % pour ces derniers cas), les comprimés ou tablettes effervescentes.

Le peptide selon l'invention peuvent encore être utilisés sous forme de poudres pour poudrage ; on peut aussi utiliser une composition comprenant 50 g de matière active et 950 g de talc ; on peut aussi utiliser une composition comprenant 20 g de matière active, 10 g de silice finement divisée et 970 g de talc ; on mélange et broie ces constituants et on applique le mélange par poudrage.

Comme formes de compositions liquides ou destinées à constituer des compositions liquides lors de l'application, on peut citer les solutions, en particulier les concentrés solubles dans l'eau, les concentrés émulsionnables, les émulsions, les suspensions concentrées, les aérosols, les poudres mouillables (ou poudre à pulvériser), les pâtes, les gels.

Les concentrés émulsionnables ou solubles comprennent le plus souvent 10 à 80 % de matière active, les émulsions ou solutions prêtes à l'application contenant, quant à elles, 0,001 à 20 % de matière active.

En plus du solvant, les concentrés émulsionnables peuvent contenir quand c'est nécessaire, 2 à 20 % d'additifs appropriés comme les stabilisants, les agents tensio-actifs, les agents de pénétration, les inhibiteurs de corrosion, les colorants ou les adhésifs précédemment cités.

A partir de ces concentrés, on peut obtenir par dilution avec de l'eau des émulsions de toute concentration désirée, qui conviennent particulièrement à l'application sur les cultures.

A titre d'exemple, voici la composition de quelques concentrés émulsionnables :

Exemple CE 1 :

- matière active	400 g/l
- dodécylbenzène sulfonate alcalin	24 g/l
- nonylphénol oxyéthylé à 10 molécules d'oxyde d'éthylène	16 g/l
- cyclohexanone	200 g/l
- solvant aromatique	q.s.p. 1 litre

Selon une autre formule de concentré émulsionnable, on utilise :

Exemple CE 2

- matière active	250 g
- huile végétale époxydée	25 g
- mélange de sulfonate d'alcoylaryle et d'éther de polyglycol et d'alcools gras	100 g
- diméthylformamide	50 g
- xylène	575 g

Les suspensions concentrées, également applicables en pulvérisation, sont préparées de manière à obtenir un produit fluide stable ne se déposant pas et elles contiennent habituellement de 10 à 75 % de matière active, de 0,5 à 15 % d'agents tensioactifs, de 0,1 à 10 % d'agents thixotropes, de 0 à 10 % d'additifs appropriés, comme des anti-mousses, des inhibiteurs de corrosion, des stabilisants, des agents de pénétration et des adhésifs et, comme support, de l'eau ou un liquide organique dans lequel la matière active est peu ou pas soluble : certaines matières solides organiques ou des sels minéraux

peuvent être dissous dans le support pour aider à empêcher la sédimentation ou comme antigels pour l'eau.

A titre d'exemple, voici une composition de suspension concentrée :

Exemple SC 1 :

- matière active	500 g
- phosphate de tristyrylphénol polyéthoxylé	50 g
- alkylphénol polyéthoxylé	50 g
- polycarboxylate de sodium	20 g
- éthylène glycol	50 g
- huile organopolysiloxanique (antimousse)	1 g
- polysaccharide	1,5 g
- eau	316,5 g

Les poudres mouillables (ou poudre à pulvériser) sont habituellement préparées de manière qu'elles contiennent 20 à 95 % de matière active, et elles contiennent habituellement, en plus du support solide, de 0 à 30 % d'un agent mouillant, de 3 à 20 % d'un agent dispersant, et, quand c'est nécessaire, de 0,1 à 10 % d'un ou plusieurs stabilisants et/ou autres additifs, comme des agents de pénétration, des adhésifs, ou des agents antimottants, colorants, etc...

Pour obtenir les poudres à pulvériser ou poudres mouillables, on mélange intimement les matières actives dans les mélangeurs appropriés avec les substances additionnelles et on broie avec des moulins ou autres broyeurs appropriés. On obtient par là des poudres à pulvériser dont la mouillabilité et la mise en suspension sont avantageuses ; on peut les mettre en suspension avec de l'eau à toute concentration désirée et ces suspensions sont utilisables très avantageusement en particulier pour l'application sur les feuilles des végétaux.

A la place des poudres mouillables, on peut réaliser des pâtes. Les conditions et modalités de réalisation et d'utilisation de ces pâtes sont semblables à celles des poudres mouillables ou poudres à pulvériser.

A titre d'exemple, voici diverses compositions de poudres mouillables (ou poudres à pulvériser) :

Exemple PM 1

- matière active	50%
- alcool gras éthoxylé (agent mouillant)	2,5%
- phényléthylphénol éthoxylé (agent dispersant)	5%

- craie (support inerte) 42,5%

Exemple PM 2 :

- matière active	10%
- alcool synthétique oxo de type ramifié, en C13 éthoxylé par 8 à 10 oxyde d'éthylène (agent mouillant)	0,75%
- lignosulfonate de calcium neutre (agent dispersant)	12%
- carbonate de calcium (charge inerte)	q.s.p. 100 %

Exemple PM 3 :

Cette poudre mouillable contient les mêmes ingrédients que dans l'exemple précédent, dans les proportions ci-après :

- matière active	75%
- agent mouillant	1,50%
- agent dispersant	8%
- carbonate de calcium (charge inerte)	q.s.p. 100%

Exemple PM 4 :

- matière active	90%
- alcool gras éthoxylé (agent mouillant)	4%
- phényléthylphénol éthoxylé (agent dispersant)	6%

Exemple PM 5 :

- matière active	50%
- mélange de tensio-actifs anioniques et non ioniques (agent mouillant)	2,5%
- lignosulfonate de sodium (agent dispersant)	5%
- argile kaolinique (support inerte)	42,5%

Les dispersions et émulsions aqueuses, par exemple les compositions obtenues en diluant à l'aide d'eau une poudre mouillable ou un concentré émulsionnable selon l'invention, sont comprises dans le cadre général de la présente invention. Les émulsions peuvent être du type eau-dans-l'huile ou huile-dans-l'eau et elles peuvent avoir une consistance épaisse comme celle d'une "mayonnaise".

Les composés selon l'invention peuvent être formulés sous la forme de granulés dispersibles dans l'eau également compris dans le cadre de l'invention.

Ces granulés dispersibles, de densité apparente généralement comprise entre environ 0,3 et 0,6 ont une dimension de particules généralement comprise entre environ 150 et 2000 et de préférence entre 300 et 1500 microns.

La teneur en matière active de ces granulés est généralement comprise entre environ 1 % et 90 %, et de préférence entre 25 % et 90 %.

Le reste du granulé est essentiellement composé d'une charge solide et éventuellement d'adjuvants tensio-actifs conférant au granulé des propriétés de dispersibilité dans l'eau. Ces granulés peuvent être essentiellement de deux types distincts selon que la charge retenue est soluble ou non dans l'eau. Lorsque la charge est hydrosoluble, elle peut être minérale ou, de préférence, organique. On a obtenu d'excellents résultats avec l'urée. Dans le cas d'une charge insoluble, celle-ci est de préférence minérale, comme par exemple le kaolin ou la bentonite. Elle est alors avantageusement accompagnée d'agents tensio-actifs (à raison de 2 à 20 % en poids du granulé) dont plus de la moitié est, par exemple, constituée par au moins un agent dispersant, essentiellement anionique, tel qu'un polynaphtalène sulfonate alcalin ou alcalino terreux ou un lignosulfonate alcalin ou alcalino-terreux, le reste étant constitué par des mouillants non ioniques ou anioniques tel qu'un alcoyl naphtalène sulfonate alcalin ou alcalino-terreux.

Par ailleurs, bien que cela ne soit pas indispensable, on peut ajouter d'autres adjuvants tels que des agents anti-mousse.

Le granulé selon l'invention peut être préparé par mélange des ingrédients nécessaires puis granulation selon plusieurs techniques en soi connues (drageoir, lit fluide, atomiseur, extrusion, etc...). On termine généralement par un concassage suivi d'un tamisage à la dimension de particule choisie dans les limites mentionnées ci-dessus. On peut encore utiliser des granulés obtenus comme précédemment puis imprégnés avec une composition contenant la matière active.

De préférence, il est obtenu par extrusion, en opérant comme indiqué dans les exemples ci-après.

Exemple GD1 : Granulés dispersibles

Dans un mélangeur, on mélange 90 % en poids de matière active et 10 % d'urée en perles. Le mélange est ensuite broyé dans un broyeur à broches. On obtient une poudre que l'on humidifie avec environ 8 % en poids d'eau. La poudre humide est extrudée dans une extrudeuse à rouleau perforé. On obtient un granulé qui est séché, puis concassé et tamisé, de façon à ne garder respectivement que les granulés d'une dimension comprise entre 150 et 2000 microns.

Exemple GD2 : Granulés dispersibles

Dans un mélangeur, on mélange les constituants suivants :

M1

- matière active	75%
- agent mouillant (alkylnaphtalène sulfonate de sodium)	2%
- agent dispersant (polynaphtalène sulfonate de sodium)	8%
- charge inerte insoluble dans l'eau (kaolin)	15%

Ce mélange est granulé en lit fluide, en présence d'eau, puis séché, concassé et tamisé de manière à obtenir des granulés de dimension comprise entre 0,15 et 0,80 mm.

Ces granulés peuvent être utilisés seuls, en solution ou dispersion dans de l'eau de manière à obtenir la dose cherchée. Ils peuvent aussi être utilisés pour préparer des associations avec d'autres matières actives, notamment antifongiques, ces dernières étant sous la forme de poudres mouillables, ou de granulés ou suspensions aqueuses.

En ce qui concerne les compositions adaptées au stockage et au transport, elles contiennent plus avantageusement de 0,5 à 95 % (en poids) de substance active.

L'invention concerne également un procédé pour le traitement antifongique thérapeutique pour l'homme ou l'animal par administration d'une dose efficace du peptide selon l'invention, sous forme libre ou, le cas échéant, sous forme de sels d'addition avec un acide, de sels métalliques ou de sels d'addition avec une base pharmaceutiquement acceptables, à l'état pur ou sous forme d'une composition dans laquelle il est associé à tout autre produit pharmaceutiquement compatible, pouvant être inerte ou physiologiquement actif. Les médicaments selon l'invention peuvent être administrés par voie orale, parentérale, rectale ou topique.

Comme compositions solides pour administration orale peuvent être utilisés des comprimés, pilules, poudres (notamment dans des capsules de gélatine ou des cachets) ou granulés. Dans ces compositions, le produit actif selon l'invention est mélangé à un ou plusieurs diluants inertes, tels que amidon, cellulose, saccharose, lactose ou silice. Ces compositions peuvent également comprendre des substances autres, par exemple un ou plusieurs lubrifiants tel que le stéarate de magnésium ou la talc, un colorant, un enrobage (dragées) ou un vernis.

Comme compositions liquides pour administration orale, on peut utiliser des solutions, des suspensions, des émulsions, des sirops, et des élixirs pharmaceutiquement acceptable contenant des diluants inertes tels que l'eau, l'éthanol, le glycérol, les huiles végétales ou l'huile de paraffine. Ces compositions peuvent également comprendre des substances autres, par exemple des produits mouillants, édulcorants, épaississants, aromatisants ou stabilisants..

Les compositions stériles pour administration parentérale peuvent être de préférence des solutions aqueuses ou non aqueuses, des suspensions ou des émulsions. Comme solvant ou véhicule, on peut employer l'eau, le propylène glycol, un polyéthylène

glycol, des huiles végétales, en particulier l'huile d'olive, des esters organiques convenables. Ces compositions peuvent également contenir des adjuvants, en particulier des agents mouillants, isotonisants, émulsifiants, dispersants et stabilisants. La stérilisation peut se faire de différentes façons, par exemple par filtration aseptisante, en incorporant à la composition des agents stérilisants, par irradiation ou par chauffage. Elles peuvent être également préparées sous forme de compositions solides stériles, qui peuvent être dissoutes au moment de l'emploi dans un milieu stérile injectable.

Les compositions pour administration rectale sont les suppositoires ou les capsules rectales, qui contiennent, outre le peptide actif, des excipients tels que le beurre de cacao, des glycérides semi-synthétiques ou des polyéthylène glycols.

Les compositions stériles pour administration topique peuvent être par exemple des crèmes, pommades, lotions, collyres, collutoires, gouttes nasales ou aérosols.

En thérapeutique humaine, le peptide selon l'invention est particulièrement utile dans les traitement antifongiques. Les doses dépendent de l'effet recherché et de la durée du traitement; elles sont généralement comprises entre 50 et 1000 mg par jour par voie orale pour un adulte en une ou plusieurs perises.

D'une façon générale, le médecin déterminera la posologie qu'il estime la plus appropriée en fonction de l'âge, du poids et de tous les autres facteurs propres au sujet à traiter.

Les exemples suivants sont donnés à titre non limitatif illustrent les compositions selon l'invention.

Exemple A:

On prépare, selon la technique habituelle, des comprimés dosés à 50 mg de peptide actif ayant la composition suivante:

- peptide drosomycine	50 mg
- amidon	60 mg
- lactose	50 mg
- stéarate de magnésium	2 mg

Exemple B:

On prépare une solution injectable contenant 20 mg de peptide actif ayant la composition suivante:

- peptide drosomycine	22.4 mg
- eau distillée	q.s.p. 2 cm ³

Par maladies fongiques, on entend les maladies causées par les champignons pathogènes,) notamment ceux de la famille des fungi imperfecti en particulier les moniliales ou encore ceux de la famille des hyprocréales ou de celle des sphaeriales.

REVENDICATIONS

1. Peptide de formule:

DCLSGRYKGP CAVWDNETCR RVCKEEGRSS GHCSPSLKCW CEGC

2. Composition antifongique caractérisée en ce qu'elle contient comme matière active un peptide de formule:

DCLSGRYKGP CAVWDNETCR RVCKEEGRSS GHCSPSLKCW CEGC

3. Composition selon la revendication 1 utilisable pour la protection des plantes contre les champignons pathogènes.
3. Composition selon la revendication 1 utilisable contre les champignons pathogènes humains ou animaux.
4. Procédé de préparation du peptide de formule:

DCLSGRYKGP CAVWDNETCR RVCKEEGRSS GHCSPSLKCW CEGC

caractérisé en ce que, successivement:

- a) on fait agir sur des drosophiles au moins un inducteur bactérien de la synthèse biologique de la molécule;
- b) on effectue l'extraction par mise en contact d'hémolymphes ou d'un broyat de drosophiles obtenues précédemment avec un milieu acide à neutre sous agitation, puis par centrifugation;
- c) on fractionne le surnageant avec séparation par lavage des molécules hydrophiles et élution des molécules hydrophobes par des éléments appropriés, sur colonne séparatrice;
- d) on purifie les extraits;
- e) on effectue le séquençage.

- 15
- 5 Procédé selon la revendication 4, caractérisé en ce qu' on utilise comme inducteur bactérien une bactérie (Gram positif).
 - 6 Procédé selon la revendication 4, caractérisé en ce qu' on utilise comme inducteur bactérien une bactérie (Gram négatif).
 - 7 Procédé de protection des plantes contre les maladies fongiques des plantes , caractérisées en ce qu'on utilise un peptide de formule:

DCLSGRYKGP CAVWDNETCR RVCKEEGRSS GHCSPSLKCW CEGC

RAPPORT DE RECHERCHE
PRELIMINAIREétabli sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

2725992

N° d'enregistrement
national

FA 506269

FR 9413044

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
A	IMMUNOLOGY TODAY, vol. 13, no. 10, Octobre 1992 CAMBRIDGE GB, pages 411-415, J.A. HOFFMANN AND C. HETRU 'Insect defensins; inducible antibacterial peptides' * page 414, colonne de droite, alinéa 2 - alinéa 4; figures 1,2,4 * ---	1-3,7
A	FEBS LETTERS, vol. 325, no. 1,2, 23 Juin 1993 AMSTERDAM NL, pages 63-66, J.A. HOFFMANN ET AL. 'The humoral antibacterial response of Drosophila' * page 63, colonne de droite, alinéa 3 - page 64, colonne de gauche, dernier alinéa; figure 1 * ---	1-3,7
A	JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 267, no. 22, 5 Août 1992 MD US, pages 15301-15309, F.R.G TERRAS ET AL. 'Analysis of Two Novel Classes of Plant Antifungal Proteins from Radish (Raphanus sativus L.) Seeds' * page 15306, colonne de droite, alinéa 3; figure 6 * --- -/--	1-3,7
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.CL.6)
		C07K A61K A01N
Date d'achèvement de la recherche		Examinateur
30 Mai 1995		Fuhr, C
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES		
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons A : membre de la même famille, document correspondant		

2

EPO FORM 1303 03.92 (P04.CU)

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
A	JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 268, no. 26, 5 Juin 1993 BALTIMORE, MD US, pages 12055-12061, R. IIJIMA ET AL. 'Purification, Characterization, and cDNA cloning of an Antifungal Protein from the Hemolymph of Sarcophaga peregrina (Flesh Fly) Larvae' * page 12059, colonne de droite, dernier alinéa - page 12060, colonne de droite, dernier alinéa; figure 8 *	1-3,7
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. CL. 6)
Date d'achèvement de la recherche 30 Mai 1995		Examinateur Fuhr, C
<p>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons A : membre de la même famille, document correspondant</p>		

2

EPO FORM 150 (03.92) (PCT)